



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARCELO HENRIQUE DE NÓVOA NETTO

EFEITO DA PIPLARTINA SOBRE A FAGOCITOSE DE FORMAS PROMASTIGOTAS
DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUN-
DONGOS SWISS

Trabalho de conclusão de curso, apresentado no
formato de artigo científico ao UniCEUB como re-
quisito parcial para a conclusão do curso de Bacha-
relado em Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª. Dra Maria Creuza do Espírito
Santo Barros

BRASÍLIA
2016

Ao laboratório de Imunologia Celular da Universidade de Brasília, bem como todo o seu corpo docente, em especial às professoras Doutoradas Tatiana Karla dos Santos Borges e Selma Aparecida de Souza Kuckelhaus por sempre me incentivarem.

EFEITO DA PIPLARTINA SOBRE A FAGOCITOSE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS

Marcelo Henrique de Nóvoa Netto¹

Maria Creuza do Espírito Santo Barros²

Resumo

Infecções hospitalares causadas por micro-organismos resistentes, além do surgimento de resistência contra várias doenças parasitárias como a tripanossomíase e a leishmaniose deixa claro que medidas contra a resistência necessitam de intervenções urgentes. Plantas da família Piperaceae são muito conhecidas na medicina popular contra dores, reumatismo e inflamações em geral. Substâncias extraídas de diversas partes das plantas do gênero *Piper* apresentam uma excelente ação microbicida e inseticida. Dentre essas substâncias encontra-se a pipartina, uma amida com comprovado efeito anti-protozoários, tornando-a um agente atrativo contra alguns micro-organismos como o *Trypanosoma* e a *Leishmania*, a exemplo. O objetivo deste trabalho é determinar o efeito da pipartina sobre a aderência de macrófagos e na fagocitose de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* por macrófagos peritoneais de camundongos swiss visando futuras aplicações biomédicas e biotecnológicas da pipartina. Observou-se neste trabalho, uma redução do percentual de macrófagos aderidos e infectados, ou não, às lamínulas com as diferentes concentrações de pipartina em relação ao controle. A pipartina parece ser um promissor princípio ativo e que parece possuir efeito na atuação no citoesqueleto do macrófago, podendo ser responsável pela diminuição da ação fagocitária do mesmo. Faz-se necessária a busca pelo melhor entendimento do princípio ativo para uma melhor elucidação seja contra a leishmania, seja contra a resposta imunológica do hospedeiro.

Palavras-chave: Polipeptídeo. *Leishmania*. Pipartina. Ação microbicida.

¹ Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

² Mestre em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília – UnB; Doutora em Biologia Molecular pela UnB.

DETERMINATION OF THE PIPLARTINA EFFECT ABOVE PROMASTIGOTES FORM OF *Leishmania amazonensis* BY PERITONEAL MACROPHAGES OF SWISS MICE.

Abstract

Nosocomial infections caused by resistant microorganisms, besides the surge of resistance against different parasitic diseases such as trypanosomiasis and leishmaniasis, make clear that measures against the resistance require urgent interventions. Piperaceae family plants are well known in the folk medicine for pain, rheumatism and inflammation in general. Extracted substances from various parts of the Piper genus plants have shown an excellent microbicidal and insecticidal action. Among these substances is the piplartine, an amide that demonstrated an antiprotozoal effect, making it as an attractive agent against some microorganisms such as trypanosomes and Leishmania. The objective of this study is to determine the effect of piplartine on the adhesion of macrophages and in the phagocytosis of promastigotes forms of *Leishmania Amazonensis* by peritoneal macrophages of swiss mice, aiming future biomedical and biotechnological piplartine applications. It was observed a reduction in the percentage of adherence and infected macrophages or not to the slides with different piplartine concentrations compared to the control. The piplartine appears to be an active promising principle that seems to have the effect in the performance of the macrophages' cytoskeleton. It might be responsible for a decrease in the phagocytosis. Hence, new researchers are necessary due a need in a better comprehension of the immune response and the general effects of the piplartine.

Keywords: Polypeptide. Leishmania. Piplartine. Microbicide action.

1. Introdução

Diversos lugares do mundo sofrem com a resistência crescente a antimicrobianos, a qual compromete a manutenção da vida e a efetividade dos programas de saúde. Doenças com causas bacterianas, virais e parasitárias a exemplo de malária, leishmaniose, sarampo, AIDS e infecções respiratórias correspondem a 85% da mortalidade por infecções em todo o planeta e, a resistência aos medicamentos contra tais doenças, crescem significativamente. Adicionando-se a isso, as infecções hospitalares causadas por micro-organismos resistentes, o surgimento de resistência contra antivirais e contra doenças parasitárias como a tripanossomíase e a leishmaniose (WHO, 2010) deixam claro que esse problema necessita de ações urgentes. A leishmaniose é uma das doenças que mais acometem a população brasileira, com uma incidência de mais de 3400 casos só em 2014, sendo que destes, 58% estão localizados na região norte do país já que o flebotômio transmissor do parasito possui maior incidência nesta região (BRASIL, 2016).

Nos últimos anos a indústria farmacêutica tem se empenhado muito em investir na modificação de fármacos já comercializados, como os conhecidos antibióticos de última geração, mas muito pouco se tem feito para a geração de princípios ativos novos que se contraponham à emergência de infecções geradas como fruto da resistência aos antibióticos. Encorajar o desenvolvimento de novas drogas é uma das estratégias que a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem para conter o avanço e disseminação da resistência aos antimicrobianos.

Dentre as diversas doenças existentes, a Leishmaniose é uma Infecção intracelular obrigatória, presente entre as nove mais comuns doenças tropicais do mundo e pouco explorada, ora pela sua complexidade epidemiológica, ora pela ecologia envolvida, além de se tratar de uma doença relativamente negligenciada, a leishmaniose ocorre de forma problemática em distribuição focal e em áreas isoladas (ALVAR *et al.*, 2012). A leishmaniose é uma doença transmitida pela picada do, usualmente conhecido, mosquito-palha do gênero *Lutzomyia*, onde a forma promastigota adentra à pele, sendo em seguida fagocitada por fagócitos mononucleares presentes. Em seguida, as formas promastigotas, presentes no interior dos macrófagos, se transformam em formas amastigotas do protozoário, multiplicando-se por divisão simples em diversos tecidos corporais, causando a ruptura celular de macrófagos sendo, então, novamente fagocitada pelas células mononucleares de fagocitose (ALVAR *et al.*, 2012; PETERSEN; GREENLEE, 2011).

Por terem um tempo de sobrevivência diferenciado em relação aos neutrófilos, os macrófagos possuem um papel principal na leishmaniose. As formas promastigotas de *Leishmania* após serem lançadas na corrente sanguínea e serem fagocitadas, internalizam-se aos fagolisossomos dos macrófagos, onde, posteriormente é alvejado pelos lisossomos que teriam um papel crucial na eliminação de micro-organismos fagocitados. Nesse caso, o protozoário consegue resistir à alta variação de pH que o eliminaria, sendo um dos poucos capazes de resistir à ação das enzimas lisossomais (LIU; UZONNA, 2012).

Os seres vivos, diariamente são expostos a uma grande quantidade de potenciais agentes patogênicos que podem desencadear doenças infecciosas ou até mesmo levar à morte, sugerindo que seus mecanismos de defesa são essenciais na habilidade humana de evitar infecções (HANCOCK; SAHL, 2006). Tanto animais quanto plantas desenvolveram ao longo do período evolutivo mecanismos inatos de defesa contra patógenos, dentre os quais podemos destacar a produção de uma série de substâncias bio-ativas nos locais expostos ou naqueles em contato indireto com o meio ambiente, que podem ou não ter aplicação biomédica em seres humanos.

Plantas da família *Piperaceae* são muito conhecidas na medicina popular contra febre, dores, inflamação em geral, reumatismo, asma, bronquite, doenças intestinais, respiratórias e renais. Compostos isolados de diferentes partes (caule, raiz, folha, fruto e semente) de espécies do gênero *Piper* apresentaram efeitos fungicida (LAGO *et al.*, 2004; MORANDIM *et al.*, 2010) e têm sido estudados quanto a possíveis efeitos microbicidas, inseticida (SCOTT *et al.*, 2002; REGASINI *et al.*, 2009), antibacteriano e antimalárico (ISOBE *et al.*, 2002). Dentre essas substâncias, a piplartina é uma amida com comprovado efeito ansiolítico, anti-inflamatório, antiplaquetário e antitumoral (BEZERRA *et al.*, 2005; 2006; 2008; FELIPE *et al.*, 2007; FONTENELE *et al.*, 2009). Além disso, o efeito antiparasitário da piplartina foi identificado em formas promastigotas de *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi* (BODIWALA *et al.*, 2007; COTINGUIBA *et al.*, 2009). Apesar de seu potencial microbicida até o momento não há estudos que relacionem seus efeitos sobre as células do sistema imunitário e tampouco estudos voltados para a elucidação dos seus mecanismos microbicidas.

Desse modo, o objetivo deste trabalho é determinar o efeito da piplartina na aderência de macrófagos e na fagocitose de formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, visando a futuras aplicações biomédicas e biotecnológicas.

2. Metodologia

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* de fase pré-clínica, onde foram utilizadas células peritoneais de camundongos SWISS não isogênicos e formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*, advindas do biorepositório do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) pertencente à Universidade de Brasília. Durante a fase experimental os camundongos foram mantidos no alojamento da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, alimentados com ração balanceada e água *ad libitum* e em respeito aos critérios e normas estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Lei nº 11.794/2008 (Lei Arouca). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética no Uso Animal (CEUA) do instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, de protocolo UnB Doc nº 126599/2013. Esse modelo animal foi escolhido por ser um mamífero com sistemas orgânicos semelhantes aos dos humanos, de fácil manipulação e heterogeneidade; essas características proporcionaram uma melhor representatividade em comparação com o homem.

Os camundongos (n=8) depois de eutanasiados em câmara de CO₂, foram submetidos à lavagem da cavidade peritoneal com salina tamponada com fosfato (STF) pH 7,2, 4°C para a coleta das células peritoneais. Depois de coletadas as suspensões foram centrifugadas a 400xg por 10 min, quantificadas, distribuídas (2x10⁵ células/escavação) em placa de micro cultivo de 24 escavações contendo lamínulas para a aderência das células e incubadas por 2 h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), num volume de 500 µL de meio, para a obtenção dos macrófagos. Decorrida essa incubação, as escavações foram lavadas com STF pH 7,2, 37°C e em seguida adicionadas com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (10⁶/escavação), na presença ou não de diferentes concentrações de piplartina (0, 100, 500 ou 1000 ng/mL). Após a incubação, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para a remoção das leishmanias não ingeridas e então, foram secas, fixadas com metanol, coradas com solução de Giemsa a 10% e avaliadas com microscopia óptica (1000x). O efeito de diferentes concentrações de piplartina foi avaliado pela determinação (em 200 macrófagos) do percentual de macrófagos infectados e pela quantificação das células aderidas em 1,2% da área da lamínula.

Os dados observados foram analisados empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Bartlett para determinar a normalidade e a variabilidade das amostras, respectivamente. O Teste t pareado ou Wilcoxon foram usados para comparar duas amostras normais ou

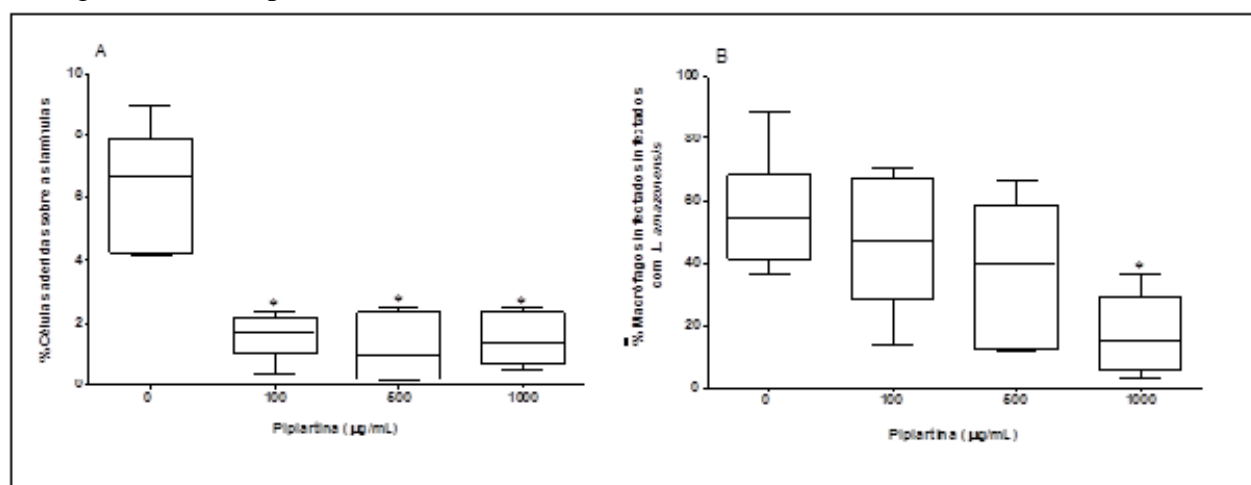
não normais, respectivamente. As análises e as representações gráficas serão feitas com o programa Prism® Software Package (GraphPad, USA, 1997). Diferenças de $p < 0,05$ serão consideradas significantes.

3. Resultados

Os resultados mostraram que as diferentes concentrações de piplartina (100, 500 ou 1000 ng/mL) causaram redução na mediana do percentual de macrófagos aderidos sobre as lamínulas na comparação com o controle (6,7%) para 1,7 com 100 ng/mL, para 1% com 500 ng/mL ou para 1,4% com 1000 ng/mL (Wilcoxon; $p < 0,005$).

Também, observou-se que nos macrófagos aderidos sobre as lamínulas, a maior concentração de piplartina (1000 ng/mL) causou redução no percentual de macrófagos infectados com *L. amazonensis* para 15,8% na comparação com o controle (54,3%) (Teste t pareado; $p = 0,0172$); as demais concentrações não afetaram o percentual de macrófagos infectados (500 ng/mL = 47,5%; 1000 ng/mL = 40%) (Teste t pareado; $p > 0,005$).

Figura 1: Efeito da piplartina no percentual de aderência de macrófagos e no percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis*.



(A) Diferentes concentrações de piplartina reduziram o percentual de macrófagos aderidos ($p < 0,05$). (B) A maior concentração da droga causou redução no percentual de macrófagos infectados (Teste t pareado; $p < 0,05$). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos. Os (*) indicam os valores diferentes do controle.

4. Discussão

Diferentes drogas estão sendo criadas com a finalidade de melhorar a resposta antimicrobiana contra os diferentes tipos de patógenos. No entanto, a busca por diferentes fármacos esbarra no grau de toxicidade que esses possam ter, como é o caso da Piplartina, droga que possui efeito citotóxico contra células tumorais (BEZERRA *et al.*, 2006) e possível efeito antimicrobiano (RAPADO *et al.*, 2013). Sendo um alcaloide biológico extraído de plantas da espécie *Piper* e proveniente da flora brasileira, a Piplartina possui uma alta importância econômica e medicinal; uma droga com potencial efeito antitumoral e anti-inflamatório (SUN *et al.*, 2015) tem sido amplamente pesquisada e utilizada na medicina tradicional em eliminação da placenta, doenças pancreáticas, bronquites, tosses, doenças respiratórias, além de possuir ação antimicrobiana, em particular contra a malária, hepatite viral e gonorreia (BEZERRA *et al.*, 2013).

A Piplartina vem sendo estudada com a finalidade de esclarecer sua possível atuação nos efeitos microbicidas contra a *Leishmania amazonensis*, já que, recentemente vem se reportando um aumento significativo do número de pessoas imunodeficientes, infectadas por leishmaniose e que possuem baixa aceitabilidade das drogas comumente comerciais devido a uma resistência do protozoário contra as mesmas, dificultando o tratamento e aumentando a mortalidade por Leishmaniose (HERMOSO *et al.*, 2003).

Estudos vêm relatando uma atuação *in Vitro* significativa contra a leishmania, advindo do uso da Piplartina para diminuição da ação parasitária do protozoário (BODIWALA *et al.*, 2007). A eficácia da Piplartina pode estar associada à sobrevida do protozoário, bem como alteração no meio de reprodução ou sua atividade motora. Dessa forma, estudos vêm apontando como forma de alteração pela Piplartina a mudança na conformação do citoesqueleto do parasito ou pela redução da atuação do mesmo *in vitro* (MORAES *et al.*, 2011; BODIWALA *et al.*, 2007).

Estudos de Flores *et al.*, (2008), elucidaram a ideia de que a Piplartina pode ter ação antimicrobicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, diminuindo em 50% a viabilidade das formas *In Vitro*. Sendo assim, nota-se na análise estatística apresentada que a quantidade maior de Piplartina possibilitou uma possível diminuição da infectabilidade dos macrófagos expostos aos parasitos; essa quantidade de parasitos fagocitados e/ou aderidos foi menor, à medida que a concentração de piplartina diminuiu, mostrando que a quantidade da droga era diretamente proporcional à quantidade de Leishmanias presentes.

Outros estudos presenciaram que a Piplartina possui ação citotóxica contra algumas células tumorais (BEZERRA *et al.*, 2006; JYOTHI *et al.*, 2009), o que pode nos levar a crer que células da resposta inata como os macrófagos podem sofrer efeito da citotoxicidade da Piplartina, podendo levar à diminuição da expressão de proteínas de adesão dessas células, impossibilitando sua aderência às lâminas em estudo. Após as contagens das lâminas do presente estudo, foi possível observar a presença de macrófagos pouco aderidos às lâminas, mas com evidência de fagocitose de formas promastigotas de *Leishmanias*. Entretanto, é provável que a presença, mesmo que em pequena quantidade, da Piplartina, ou tenha causado diminuição da exposição dos sítios de aderência dos macrófagos, impossibilitando sua perfeita adesão às lâminas em estudo, ou diminuição da atividade do citoesqueleto dos macrófagos, inibindo a exposição de pseudópodes para captura das formas parasitárias.

5. Conclusão

Muitos são os fármacos que fazem parte da escolha contra parasitos, no entanto, o número de casos de pessoas que possuem resistência antimicrobiana tem aumentado significativamente, ora pelo uso de medicamentos não recomendados e incorreto para cada parasito, ora pelo avanço de sobrevivência dos micro-organismos. Dessa forma, faz-se necessária a pesquisa constante de novos princípios-ativos para uma manutenção da qualidade de vida das pessoas, bem como a melhoria na saúde pública.

No presente estudo foi observado uma redução no percentual de macrófagos aderidos às lamínulas, além de uma redução no percentual de macrófagos infectados. Subtende-se, assim que, uma possível ação da piplartina pode desencadear uma interação no citoesqueleto dos macrófagos, diminuindo a projeção dos pseudópodes das células. Estas observações, devem-se, possivelmente ao efeito inibidor que a piplartina parece possuir, já que a diminuição da aderência e a diminuição da fagocitose ocorreram após a interação celular com os diferentes níveis de piplartina, em relação ao estudo controle.

Desse modo, a piplartina parece ser um promissor princípio ativo e que necessita de maiores elucidacões. É necessário conhecer-se o grau de toxicidade da piplartina em relação às células da resposta inata, bem como o seu potencial efeito contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Assim, a piplartina parece possuir efeitos que devem ser estudados para um futuro desenvolvimento biomédico, seja para ação antiparasitária, seja para um melhor entendimento da resposta imunológica.

6. Referências Bibliográficas

BEZERRA, D. P. *et al.* Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from Piper species. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v.60, n.7, p. 539-543. jul./ago. 2005.

BEZERRA, D. P. *et al.* In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.39, n.6, p. 801-807. jun. 2006.

BEZERRA, D. P. *et al.* In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 28, n.2, p. 156-163. mar. 2008.

BEZERRA, D. P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Science**, Amsterdam, v.48, n.3, p.453-463. fev. 2013.

BODIWALA, H. S. *et al.* Antileishmanial amides and lignans from Piper cubeba and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v.61, n.4, p.418-421. out. 2007.

CONTIGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. C. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**. Ribeirão Preto, v.18, n.9, p. 703-711. nov. 2009.

ELIX, J. A.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E. **Biochemistry and Secondary Metabolites**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

FELIPE, F. C. B. *et al.* Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.14, n.9, p.605-612. mar. 2007.

FLORES, N.. *et al.* Benzoic Acid Derivatives from Piper Species and Their Antiparasitic Activity. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v.71, n.9, p.1538-1543. aug. 2008.

FONTENELE, J. B. *et al.* Antiplatelet effects of piplartine, an alkamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.61, n.4, p.511-515. abr. 2009.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**. Vancouver, v. 24, n.12, p. 1551-1557. dez. 2006.

HERMOSO, A. *et al.* Antileishmanial activities of dihydrochalcones from piper elongatum and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bio-organic & Medicinal Chemistry**. Canary Island, v.11, n.18, p. 3975-3980. sep. 2003.

HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p. 110–125. jan. 1999.

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, Tokyo, v.122, n.4, p.291–294. set. 2002.

JYOTHI, D. *et al.* Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from *Piper chaba*. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.23. n.6, p.1085-1091. set. 2009.

LAGO, J. H. *et al.* Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**. Gorakhpur, v. 61, n. 11, p. 1783-1788. nov. 2004.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, Winnipeg, v.2, n.83, p.1-8. jun. 2012.

MORAES J. D.; NASCIMENTO C.; LOPES P. O. *et al.* Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, Orlando, v.127, n.2, p.357-364, set. 2010.

MORANDIM A. A.; PIN A. R.; PIETRO N. A. S. *et al.* Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of Piper species. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, n.37, p.6135-6139. set. 2010.

MINISTÉRIO da saúde. Leishmaniose visceral. **Portal da Saúde**, 2016. Disponível em: <portal-saude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>. Acesso em: 09 de junho de 2016.

RAPADO L. N.; PINHEIRO A. S.; LOPES P. O. M. V. *et al.* Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages. **PLoS Neglected Tropical Disease**, São Paulo, v.7, n.6, p.1-8. jun. 2013.

REGASINI, L. O. *et al.* Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Araraquara. v.19, n.1, p. 199–203. Jan./mar. 2009.

SCOTT I, M. *et al.* Insecticidal activity of *piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piper amides. **Agricultural and Forest Entomology**. Ottawa. v.4, n.2, p.137-144. maio 2002.

SUN, L. *et al.* Development and mechanism investigation of a new piperlongumine derivative as a potent anti-inflammatory agent. **Biochemical Pharmacology**. Lanzhou. v.95, n.3, p. 156-169. jun. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug resistance**. Geneva, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/topics/drug_resistance/en/>. Acesso em: 28 jun 2016.